

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELAINE CRISTINA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS DA MICROALGA**  
***Acutodesmus obliquus* CULTIVADA EM EFLUENTE DE SUINOCULTURA**

CURITIBA

2016

ELAINE CRISTINA DA SILVA

**PRODUÇÃO DE CARBOIDRATOS E LIPÍDEOS DA MICROALGA**  
***Acutodesmus obliquus* CULTIVADA EM EFLUENTE DE SUINOCULTURA**

Projeto para monografia apresentado ao curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para conclusão do curso.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr. Vanessa Kava

Coorientador: Prof. Dr. André Bellin Mariano

CURITIBA

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar forças e persistência nessa caminhada, mostrando-me por meio de obstáculos que apesar de difíceis são possíveis de serem superados.

Ao meu querido noivo José Osmar Klein Junior por ter me apoiado em todas as etapas deste trabalho, me incentivando a enfrentar as batalhas e pelo amor inigualável.

A minha família que me apoiou desde o início do curso, não me deixando desistir da formação de bióloga.

A minha orientadora Vanessa Kava, pela confiança depositada em mim, pela amizade, apoio, suporte e orientação. E ao coorientador André Bellin Mariano.

Ao professor José Viriato Coelho Vargas pela a oportunidade de me integrar ao grupo do NPDEAS e pela confiança depositada em mim.

Ao Daniel Pamplona, aluno de iniciação de Ciências Biológicas por ter me ajudado nos experimentos, pelos ensinamentos e momentos de muitas risadas.

Ao laboratório de Bioquímica da UFPR, em especial a Amanda Oliveira e a Jacqueline de Souza Lemos, alunas de Doutorado do Prof. Miguel D. Nosedá pelo incansável esforço em me ajudar nos resultados, elaboração e discussão deste trabalho.

Meu agradecimento a Beatriz Santos, companheira de trabalho e amizade que faz parte da minha formação e que vai continuar presente em minha vida com certeza.

Enfim, a todos os integrantes do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável, a Lorena Moura, Gustavo Finger e Fabiana Lírio.

## RESUMO

Diferentes condições para o cultivo de microalgas *Acutodesmus obliquus* foram avaliadas com o objetivo de aumentar o conteúdo de lipídeos, carboidratos e biomassa para a produção de biodiesel e bioetanol. As variáveis investigadas nos experimentos foram: cultivo esterilizado e cultivo não esterilizado com injeção de CO<sub>2</sub> comparados a um cultivo com dejetos não esterilizados. A partir da cinética de crescimento, análise de biomassa e produção de lipídeos e carboidratos foi possível determinar a produtividade da espécie de microalga estudada. A produção de lipídeos com a injeção de CO<sub>2</sub> teve resultados significativos em comparação com as outras condições, mostrando que nenhum meio de cultivo favoreceu este aumento de teor para a produção de biodiesel. Os experimentos realizados com a injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram resultados satisfatórios com um aumento significativo na produção de carboidratos. Entre os resultados nos experimentos, a densidade celular foi melhor no cultivo com adição de CO<sub>2</sub>. As concentrações de biomassa seca total foram: 1,19 g L<sup>-1</sup> no cultivo padrão, 1,34 g L<sup>-1</sup> no cultivo com adição de CO<sub>2</sub> e 1,13 g L<sup>-1</sup> com dejetos autoclavados. O teor de lipídeos para os experimentos foi para o padrão 14,4%, 17,0% para o esterilizado e 14,6% para o cultivo com adição de CO<sub>2</sub>.

**Palavras-chave:** microalga, biodiesel, bioetanol, biomassa.

## ABSTRACT

The conditions for the cultivation of microalgae *Acutodesmus obliquus* were studied with the objective of increasing the content of lipids and carbohydrates for the production of biodiesel and bioethanol. The variables investigated in the experiments were: sterilized culture and non-sterilized cultivation with CO<sub>2</sub> injection compared to a standard non-sterilized culture from the growth kinetics, biomass analysis and production of lipids and carbohydrates, it was possible to determine the productivity of the studied microalgae species. The production of lipids with the injection of CO<sub>2</sub> did not have significant results in comparison with the other means of cultivation, showing that no cultivation medium favored this increase of content for the production of biodiesel. The experiments carried out with CO<sub>2</sub> injection showed satisfactory results regarding the carbohydrate content for bioethanol production. Among the results in the experiments, cell density was better in the CO<sub>2</sub> addition cultivation. As for total dry biomass the standard cultivation obtained a concentration of 1.19 g L<sup>-1</sup>, the one with CO<sub>2</sub> addition obtained 1.34 g L<sup>-1</sup> and the experiment with autoclaved waste obtained 1.13 g L<sup>-1</sup>. The lipid content for the experiments was 14.4%, 17.0% for the sterilized and 14.6% for the culture with addition of CO<sub>2</sub>.

**Keywords:** microalgae, biodiesel, bioethanol, biomass.

## LISTA DE FIGURAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| FIGURA 1  | – CONFIGURAÇÃO DE SISTEMA ABERTO DE CULTIVO DE MICROALGAS.....  | 18 |
| FIGURA 2  | – DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE FOTOBIOREATORES TUBULARES: A) FOTOBIOREATOR TIPO AIRLIFT; B) FOTOBIOREATOR DE 10m <sup>3</sup> .....          | 20 |
| FIGURA 3  | – MICROSCOPIA DA MICROALGA <i>Acutodesmus obliquus</i> COM AUMENTO 400X E SALA DE CULTIVO.....  | 26 |
| FIGURA 4  | – SISTEMA DE <i>AIRLIFT</i> UTILIZADO PARA O ESTUDO.....  | 28 |
| FIGURA 5  | – A) FILTRAÇÃO DA BIOMASSA; B) ASPECTO DA ÁGUA APÓS FILTRAÇÃO; C) PASTA DA BIOMASSA ANTES DA SECAGEM EM ESTUFA; D) BIOMASSA SECA MOÍDA..... | 30 |
| FIGURA 6  | – A) COLORAÇÃO DAS AMOSTRAS COM O ÁCIDO SULFÚRICO; B) EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA A ABSORBÂNCIA.....   | 34 |
| FIGURA 7  | – QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA <i>Acutodesmus obliquus</i> APÓS 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....                             | 35 |
| FIGURA 8  | – PRODUTIVIDADE OBTIDA NOS TRÊS CULTIVOS DA <i>Acutodesmus obliquus</i> APÓS 14 DIAS.....   | 36 |
| FIGURA 9  | – pH DOS CULTIVOS DA <i>Acutodesmus obliquus</i> APÓS 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....  | 37 |
| FIGURA 10 | – PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE DIFERENTES CULTIVOS DA <i>Acutodesmus obliquus</i> APÓS 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....               | 38 |
| FIGURA 11 | – TEOR DE CARBOIDRATOS DA <i>Acutodesmus obliquus</i> APÓS 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....   | 39 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 – AS 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO DA MICROALGA <i>Acutodesmus obliquus</i> .....    | 27 |
| TABELA 2 – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE DE CARBOIDRATOS..... | 34 |

## **LISTA DE SIGLAS**

- ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- NPDEAS – Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável
- TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná
- UFPR – Universidade Federal do Paraná



## LISTA DE ABREVIATURAS

|         |  |
|---------|--|
| ATP     | – Adenosina Trifosfato                         |
| BHT     | – Butilhidroxitolueno                          |
| DBO     | – Demanda Bioquímica de Oxigênio               |
| FBR     | – Fotobiorreator                               |
| RuBisCO | – Ribulose-1,5 bifosfato carboxilase oxigenase |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                 |  |
|-----------------|--|
| B               | – Biomassa seca do cultivo                   |
| B <sub>s</sub>  | – Biomassa seca da amostra                   |
| C               | – Biomassa seca                              |
| °C              | – Grau Celsius                               |
| cm              | – Centímetros                                |
| CO <sub>2</sub> | – Dióxido de Carbono                         |
| kHz             | – Quilohertz                                 |
| L               | – Litro                                      |
| mL              | – Mililitro                                  |
| pH              | – Potencial Hidrogeniônico                   |
| M <sub>1</sub>  | – Massa do microfiltro seco (g)              |
| M <sub>2</sub>  | – Massa do microfiltro com biomassa seca (g) |
| nm              | – Nanometros                                 |
| V               | – Volume de cultivo filtrado (L)             |
| V <sub>1</sub>  | – Massa do <i>vial</i> vazio (g)             |
| V <sub>2</sub>  | – Massa do <i>vial</i> com lipídeos (g)      |
| µg              | – Micrograma                                 |
| µL              | – Microlitro                                 |
| %               | – Por cento                                  |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                     | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                         | 16 |
| 2.1 Microalgas.....                                   | 16 |
| 2.2 <i>Acutodesmus obliquus</i> .....                 | 17 |
| 2.3 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS.....            | 18 |
| 2.4 Sistemas abertos.....                             | 18 |
| 2.5 Sistemas fechados.....                            | 19 |
| 2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROALGAS.....           | 20 |
| 2.7 Controle do pH.....                               | 20 |
| 2.8 Nutrientes.....                                   | 21 |
| 2.9 Meios de cultivos alternativos.....               | 22 |
| 2.10 Biodiesel.....                                   | 23 |
| 3. OBJETIVO GERAL.....                                | 25 |
| 3.1 Objetivos Específicos.....                        | 25 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS.....                           | 26 |
| 4.1 Material Biológico.....                           | 26 |
| 4.2 Preparação do inóculo e condições de cultivo..... | 26 |
| 4.3 Determinação da densidade celular.....            | 28 |
| 4.4 Determinação da biomassa seca.....                | 29 |
| 4.5 Recuperação da biomassa.....                      | 30 |
| 4.6 Determinação de lipídeos totais.....              | 31 |
| 4.7 Determinação do pH dos cultivos.....              | 33 |
| 4.8 Determinação de carboidratos.....                 | 33 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                        | 35 |
| 5.1 Quantificação de densidade celular.....           | 35 |
| 5.2 Variação do pH.....                               | 36 |
| 5.3 Quantificação de lipídeos totais.....             | 37 |
| 5.4 Quantificação de carboidratos.....                | 38 |
| 6. CONCLUSÃO.....                                     | 39 |
| 7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....          | 40 |
| REFERÊNCIAS.....                                      | 41 |

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a possível escassez de combustíveis fósseis não renováveis abriu espaço na comunidade científica para a pesquisa e o desenvolvimento de outras formas de combustíveis renováveis.

A maior dificuldade na produção de combustível renovável (i.e., bio-hidrogênio, bioetanol e biodiesel), em comparação ao combustível obtido diretamente da extração mineral, é manter o sistema energeticamente eficiente para atender a demanda com balanço positivo. Sistemas de cogeração, trigeração ou multigeração são alternativas possíveis a serem seguidas a fim de atingir esse objetivo (VARGAS *et al*, 2014).

O Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Energia Autossustentável (NPDEAS), localizado no Campus Politécnico da Universidade Federal do Paraná, é um grupo que se formou em 2007 a partir de um projeto aprovado pelo CNPq. A proposta do projeto era a construção de uma edificação Autossustentável em energia elétrica a partir de biodiesel produzido do óleo extraído de microalgas cultivadas em fotobiorreatores tubulares compactos. A unidade foi criada a partir da iniciativa de professores de diferentes áreas e atua de forma multidisciplinar nos projetos. Em 2008, outro projeto foi aprovado para aprimorar a produção de biodiesel a partir de microalgas.

Biodiesel é produzido por meio da extração do óleo contido na matéria orgânica de vegetais. Entretanto, a produção de biomassa de material vegetal consome grandes áreas cultiváveis que poderiam ser utilizadas para a produção de alimentos. Uma solução para minimizar este problema é a produção de combustível proveniente da biomassa de microalgas que necessita menor espaço para cultivo (CHISTI, 2007). O uso de microalgas para a produção de biocombustíveis apresenta-se como uma alternativa promissora no que se refere à redução de emissões de gases causadores do efeito estufa, uma vez que durante a fase de crescimento e produção de biomassa ocorre a fixação de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) através da fotossíntese.

Outras vantagens em se utilizar as microalgas residem no fato de elas poderem ser cultivadas com água residual, terem alta taxa de crescimento e

necessitarem menor quantidade de insumos (SATYANARAYANA *et al*, 2011; DE FARIAS & BERTUCCO, 2016).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em fotobiorreatores (FBRs), tanques ou lagoas artificiais. Os sistemas diferenciam-se principalmente pelo tamanho, controle, custo de montagem e de operação (SATYANARAYANA *et al*, 2011). Os crescimentos favoráveis de microalgas nos FBRs garantem a obtenção suficiente para posterior extração dos lipídeos e transesterificação dos mesmos, produzindo biodiesel de microalgas. Após a extração de lipídeos, que pode ser realizado de diversas maneiras, a biomassa residual ainda apresenta valor agregado, podendo servir de ração animal, suplementação alimentar ou ainda ser fermentada para produção de bioetanol se a quantidade de carboidratos presente for satisfatória (VIEGAS *et al.*, 2015).

Como exemplo de fotobiorreatores de sistema fechado são os tipos *Airlift* e coluna de bolhas. São fotobiorreatores tubulares verticais que têm a vantagem de ser compactos e de baixo custo, permitindo maior tempo de residência dos gases no sistema. A circulação dos gases é feita através de aeradores (MIYAWAKI, 2014).

Nesse sentido, esse estudo tem o propósito de identificar qual dos meios de cultivo de microalgas apresenta-se uma maior vantagem quanto à produção de biodiesel, bioetanol e biomassa utilizando fotobiorreatores do tipo *Airlift*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Microalgas

As microalgas são organismos pertencentes ao reino vegetal que compreendem um grupo muito diverso de organismos fotossintetizantes, unicelulares, presentes tanto nos meios aquáticos (doce ou salino), quanto no solo. Variam em tamanho, morfologia e outras características como fonte de alimento para animais e o homem, indicadores ambientais, fontes de substâncias de importância industrial, etc (LOURENÇO, 2006).

A obtenção de biomassa e de produtos metabólicos das microalgas pode ser influenciada pelas interações entre fatores biológicos, físicos e químicos (FALKOWSKI; RAVEN, 2014). Os fatores biológicos estão relacionados às taxas metabólicas características da espécie cultivada, e a influência de outros microrganismos sobre o crescimento microalgal. Os principais fatores físico-químicos são: iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes no meio e concentração de CO<sub>2</sub> (GUILLARD, 1975; RICHMOND, 2004; CHISTI, 2007).

As características de crescimento e a composição das microalgas também são significativamente dependentes do tipo de cultivo, que pode ser autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (LIANG *et al.*, 2009; AMARO *et al.*, 2011; ANDRULEVICIUTE *et al.*, 2014).

O cultivo autotrófico ocorre quando a microalga usa luz solar, por exemplo, como fonte de energia e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono para produzir energia química através do processo de fotossíntese (HUANG *et al.*, 2010).

Este tipo de cultivo tem um apelo ambiental, uma vez que o dióxido de carbono atmosférico, um dos vilões do efeito estufa, pode ser utilizado na produção de biomassa para o desenvolvimento de biocombustíveis, o que ocasionaria um balanço energético favorável. Principalmente por este motivo, o cultivo autotrófico é o mais comum usado para o crescimento de microalgas (MANDAL & MALLICK, 2009; YOO *et al.*, 2010).

Algumas espécies de microalgas podem não só crescer sob condições autotróficas, mas também podem utilizar carbono na ausência de luz. Nesse caso, no qual as algas usam o carbono orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono, é chamado de cultivo heterotrófico (XIONG *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2009).

No cultivo mixotrófico, a microalga é submetida à fotossíntese e usa compostos orgânicos e inorgânicos como fonte de carbono para o crescimento. Assim, a microalga está apta a viver tanto em condições autotróficas quanto em heterotróficas. Ao utilizar compostos orgânicos, a microalga libera CO<sub>2</sub> via respiração e este é absorvido e utilizado sob cultivo autotrófico (MATA *et al.*, 2010).

## 2.2 *Acutodesmus obliquus*

A *Acutodesmus* é um gênero pertencente à família *Scenedesmaceae* e comum em qualquer coleta de água que se faça e são os primeiros microrganismos a colonizarem ambientes como chafariz e tanques de água de jardins públicos (BICUDO & MENEZES, 2005). As espécies desse gênero são empregadas como biorremediador na remoção de nitrogênio e fósforo da água, melhorando sua qualidade em curto prazo (MARTINEZ *et al.*, 2000).

Há pouco tempo, algumas espécies do gênero *Scenedesmus* foram transferidas para o gênero *Acutodesmus* (HEGEWALD; WOLF, 2003).

A espécie *Acutodesmus obliquus* é caracterizada por ser a mais comum e cosmopolita do gênero de algas verdes. A característica taxonômica distintiva do grupo é a ocorrência de colônias planas formadas por até 16 células dispostas e demonstrado ótimo crescimento em águas residuais. Os resíduos utilizados foram dejetos suínos e bovinos, e comparados com o meio de cultivo sintético, teve uma alta eficiência (TAHER, 2013; OLIVEIRA, 2013; SILVA, 2014).

## 2.3 SISTEMAS DE CULTIVO DE MICROALGAS

### 2.4 Sistemas abertos

Tanques abertos simulam o habitat natural das microalgas e são os mais utilizados para a produção de biodiesel devido ao seu baixo custo de operação. Os tanques são tipicamente canais com circulação em formato de pista ou circulares, com profundidade entre 20-50 cm e com agitação contínua, evitando a sedimentação das células (FIGURA 01). A fonte de CO<sub>2</sub> pode ser obtida através do ar atmosférico ou com aeradores submersos para uma melhor absorção de carbono para uma maior produtividade das microalgas (BRENNAN e OWENDE, 2010, DASGUPTA *et al.*, 2010). Águas residuais podem ser utilizadas para o cultivo, e um dos problemas para este tipo de cultivo é a alta taxa de evaporação (CHEN *et al.*, 2009).

FIGURA 1 – CONFIGURAÇÃO DE SISTEMA ABERTO DE CULTIVO DE MICROALGAS.



FONTE: GREENWELL (2009).



## 2.5 Sistemas fechados

Os sistemas fechados, também conhecidos como fotobiorreatores, são confeccionados com material transparente, normalmente com plástico, vidro ou acrílico, o que possibilita uma plena penetração de luz. Esse sistema apresenta formato tubular ou cilíndrico, com disposição dos tubos verticalmente ou horizontalmente. Eles podem ser instalados em ambientes fechados, recebendo iluminação artificial, ou ao ar livre, recebendo energia solar.

Os fotobiorreatores proporcionam uma elevada produtividade, gerando mais biomassa algácea por unidade de tempo e volume. Outras vantagens comparadas com os sistemas abertos são menos evaporação, redução de contaminação por outros microrganismos, maior facilidade de coleta de biomassa, controle de trocas gasosas e menor ocupação de espaço (LOURENÇO, 2006).

Também em comparação com tanques, os fotobiorreatores têm um custo maior para a sua fabricação, porém uma das vantagens desse sistema predominantemente envolve a produção de componentes de alto valor agregado, principalmente para a indústria farmacêutica e alimentar. A FIGURA 2(A e B) representa alguma das configurações de fotobiorreatores tubulares.

FIGURA 2 - DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE FOTOBIORREATORES TUBULARES. A) FOTOBIORREATOR TIPO *AIRLIFT*; B) FOTOBIORREATOR DE 10 m<sup>3</sup>.



FONTE: A autora (2016).



FONTE: NPDEAS (2014).

## 2.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DE MICROALGAS

### 2.7 Controle do pH

O pH é uma condição variável físico-químico no cultivo e seu controle é essencial para que os componentes sejam absorvidos efetivamente pelas microalgas. O crescimento das microalgas em cultivo envolve o consumo de CO<sub>2</sub> dissolvido no meio aumentando o pH do sistema. Com isso, podem atingir níveis elevados e intoxicar muitas espécies. Isso faz com que tampões sejam adicionados ao cultivo para proporcionar variações mais discretas de pH, dentro dos níveis tolerados por algumas espécies (LOURENÇO, 2006).

Organismos fotossintetizantes consomem o dióxido de carbono em seu metabolismo celular, assim, a análise do pH é relevante para entender a intensidade do processo de fotossíntese no meio. O gás carbônico presente no

meio caracteriza o cultivo como ácido e, um pH que se eleva revela que a disponibilidade de dióxido de carbono está sendo reduzida, indicando alta atividade celular, normalmente relacionado a uma presença massiva de células (LOURENÇO, 2006).

## 2.8 Nutrientes

Os principais nutrientes para o crescimento das microalgas são: oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio, enxofre, ferro, boro, cobre, cobalto, zinco, vanádio, molibdênio e sódio (LOURENÇO, 2006). A concentração destes nutrientes podem alterar o crescimento e modificar sua composição bioquímica.

O carbono é um elemento necessário em maiores concentrações para as microalgas, uma vez que substâncias orgânicas sintetizadas pelas células, como proteínas, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e lipídeos, demandam grandes quantidades desse elemento. Em meios de cultivo, o carbono pode ser limitante ou não, dependendo da densidade do cultivo (LOURENÇO, 2006), entretanto, esse problema pode ser facilmente solucionado com adição de aeradores enriquecidos com CO<sub>2</sub>.

O nitrogênio também é um componente fundamental para substâncias estruturais das células e é encontrado no interior das células em forma inorgânica como nitrato, nitrito e amônio. O nitrogênio é um elemento importante nas formulações dos meios de cultivos, pois contribui para a formação de proteínas e clorofila das células microalgais. A redução da concentração de nitrogênio no meio de cultivo possibilita que sejam sintetizados lipídeos como componente de reserva preparando a célula para um período de privação nutricional (RIGANO *et al.*, 1998).

O fósforo está relacionado aos processos que envolvem trocas energéticas nas células e constituição de moléculas estruturais (GROBBELAAR, 2004). A assimilação do fósforo é dependente de luz, provavelmente em razão da acumulação de energia em ATP (LOURENÇO, 2006). A deficiência do fósforo no meio afeta o perfil lipídico da célula com mais

intensidade e direciona o metabolismo da microalga para a produção de triglicerídeos saturados e lipídeos neutros (SIRON et al., 1989).

O ferro possui grande importância nas vias biossintéticas da clorofila, transporte respiratório de elétrons, fotossíntese, redução de nitrito, redução de sulfato, fixação de nitrogênio molecular e cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006). A limitação de ferro no meio pode reduzir o crescimento e alterar a concentração de clorofila (PANKOWSKI, 2009).

O enxofre presente na célula é um fator limitante para o desenvolvimento das microalgas, embora faça parte da estrutura de proteínas, como cisteína e metionina (LOURENÇO, 2006).

Outro elemento utilizado em meios de culturas, é o potássio que possui funções importantes na regulação osmótica, no controle do pH e na conformação e estabilidade de proteínas (LOURENÇO, 2006).

## 2.9 Meios de cultivos alternativos

Um grande desafio na produção de microalgas para biocombustíveis em larga escala é o custo dos nutrientes adicionados à cultura, dessa maneira, meios de cultivo baixo de custo se apresentam com fontes alternativas (HARDY e CASTRO, 2000).

Uma alternativa para o tratamento dos resíduos de suinocultura é a utilização na composição e suplementação dos meios de cultivo para a produção de microalgas. Ademais, ao remover nitrogênio, carbono e fósforo do efluente, as microalgas podem auxiliar na diminuição da eutrofização dos ecossistemas aquáticos (RUIZ *et al.*, 2011; OLGUÍN, 2003).

O dejetos suíno é um dos maiores geradores de resíduos agroindustriais na atualidade podendo causar problemas ambientais se não forem processados corretamente (CARPENTER *et al.*, 1998). Dentre estes, podem ocorrer contaminação de solos e mananciais (KRAPAC *et al.*, 2002). Segundo o IBGE (2010) o Paraná é o terceiro maior produtor de porcos do Brasil, o estado possui mais de cinco milhões de cabeças. Em comparação com o esgoto

doméstico, os dejetos suínos são mais poluentes. A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) desses resíduos é aproximadamente 200 vezes maior que a dos esgotos comuns (TECPAR, 2002).

Oliveira (2013) utilizando efluente bovino biodigerido como meio de cultivo para a produção da microalga *Acutodesmus* verificou reduções de 52% na concentração de fósforo e 100% de nitrogênio amoniacal. Taher (2013) produzindo a mesma microalga em outro efluente, o suíno biodigerido alcançou redução de 99,6% na concentração de nitrogênio amoniacal e 99,3% na concentração de fósforo.

## 2.10 Biodiesel

A diminuição de reservas de petróleo faz com que a produção de combustíveis alternativos ganhe mais atenção no mundo. A combustão do diesel e da gasolina derivados do petróleo bruto emitem altas concentrações de dióxido de carbono, monóxido de carbono e óxidos de nitrogênio. A preocupação em relação aos poluentes presentes na atmosfera, assim como a diminuição das reservas de petróleo, são as principais motivações para o desenvolvimento de combustíveis renováveis (MIYAWAKI, 2014).

Segundo a Lei Federal N°. 11.097 de 13 de janeiro de 2005 o biodiesel é definido como: *biocombustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna com ignição por compressão ou, conforme regulamento para geração de outro tipo de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil.*

No Brasil, este biocombustível deve atender a especificação estabelecida pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), em sua resolução ANP n° 07/2008, na qual o biodiesel é descrito com: *“combustível composto de alquil ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais conforme a especificação contida no Regulamento Técnico, parte integrante desta resolução”.*

A fonte lipídica para a geração de biodiesel representa acima de 75% do custo de produção do biodiesel, portanto, a melhor escolha de reserva lipídica é extremamente vital (MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

As microalgas demonstram-se como uma alternativa viável para o crescimento do mercado de biodiesel. Estudos mostram que as microalgas são fáceis de cultivar e seu tempo de cultivo é menor quando comparado ao de plantas terrestres. Aliado a alta produtividade em relação às fontes oleaginosas, a biomassa residual resultante do processamento para a produção de biodiesel pode ser utilizada para a produção de biodiesel e bioetanol (CHISTI, 2007; MATA, MARTINS e CAETANO, 2010).

### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar as consequências do uso de efluente da suinocultura como meio de cultivo para a microalga *Acutodesmus obliquus* em diferentes condições, em relação à produção de carboidratos, lipídeos e biomassa.

#### 3.1 Objetivos Específicos

Para atingir o objeto geral proposto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

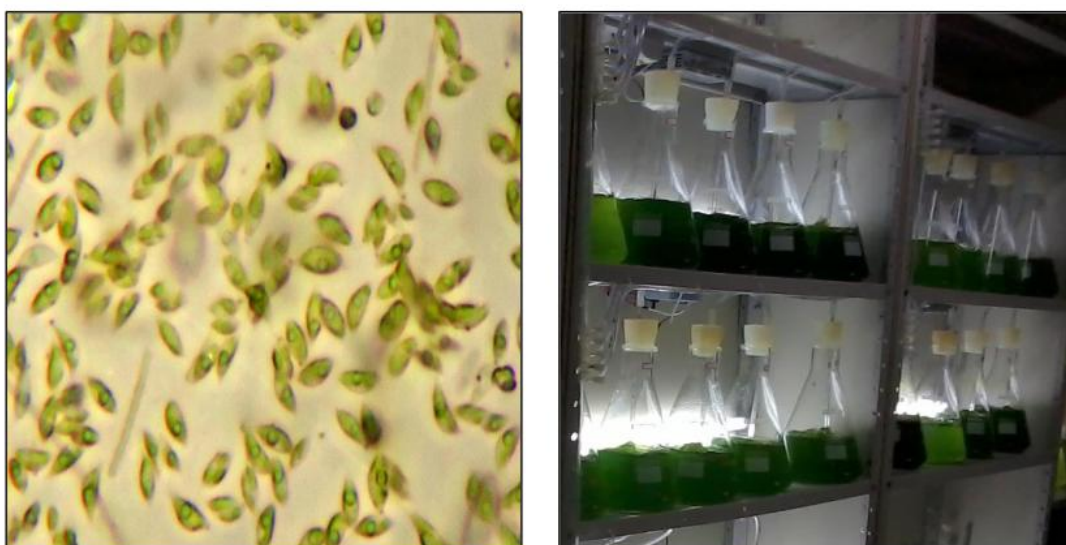
1. Avaliar o crescimento da microalga em efluente esterilizado;
2. Avaliar o crescimento da microalga em efluente não esterilizado;
3. Avaliar o crescimento da microalga em efluente não esterilizado com adição de CO<sub>2</sub> gasoso a fim de avaliar o efeito na razão carbono/nitrogênio;
4. Determinar a cinética de crescimento da microalga em todas as condições utilizadas;
5. Quantificar a produção de biomassa, lipídeos e carboidratos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material Biológico

A espécie *Acutodesmus obliquus* (FIGURA 3), utilizada nesse estudo, foi isolada a partir da água da rede de abastecimento local. Em testes nos fotobiorreatores do NPDEAS, essa microalga foi selecionada naturalmente. A manutenção e o repique das cepas foram realizados em sala de cultivo do próprio núcleo (FIGURA 3). Esta espécie de microalga está plenamente adaptada às condições de cultivo locais e se mostrou termorresistente a uma temperatura de 38°C, pois foi verificado que não houve declínio da atividade celular e nem em inverno rigoroso de -3°C.

FIGURA 3 – MICROSCOPIA DA MICROALGA *Acutodesmus obliquus* COM AUMENTO 400X E SALA DE CULTIVO.



FONTE: NPDEAS (2016).

### 4.2 Preparação do inóculo e condições de cultivo

Como inóculo para os reatores, uma amostra de um FBR tubular em escala de engenharia foi utilizada. Três litros desse cultivo com a espécie *Acutodesmus obliquus*, com contagem celular de aproximadamente  $9,00 \times 10^6$  células por  $\text{mL}^{-1}$  foi adicionado em cada reator. O restante do volume foi



preenchido com água até atingir os 11 L de cada reator. O experimento foi desenvolvido durante 18 dias em fotobiorreator *Airlift* que foi desenvolvido e patenteado pelo NPDEAS (US201288296-A1 / WO201250608-A1) com o intuito de se efetuar nele um tratamento biológico de emissões poluentes gasosas e de efluentes líquidos por meio da atividade metabólica da microalga.

TABELA 1 – AS TRÊS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA MICROALGA *Acutodesmus obliquus*.

| CONDIÇÕES                                    | AUTOCLAVADO | CO <sub>2</sub> |
|--|-------------|-----------------|
| PADRÃO<br>Dejeto suíno 5%                    | NÃO         | NÃO             |
| AUTOLCAVADO<br>Dejeto suíno 5%               | SIM         | NÃO             |
| ADIÇÃO DE CO <sub>2</sub><br>Dejeto suíno 5% | NÃO         | SIM             |

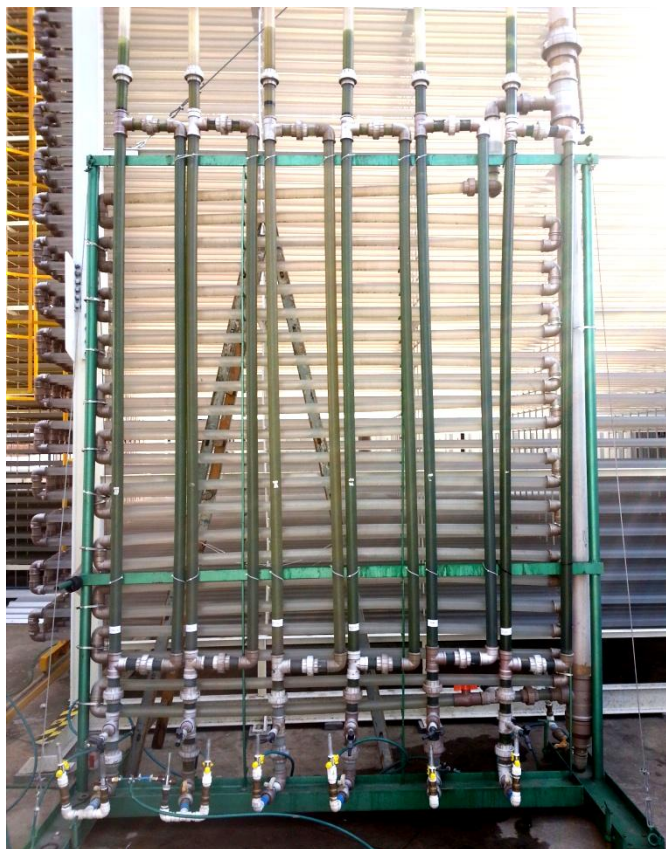
FONTE: A Autora (2016).

Esse inóculo já tinha 5% de dejeto suíno biodigerido e diluído, que foi doado de uma propriedade particular de Contenda/PR ao NPDEAS.

O efluente suíno foi utilizado sob três condições: I) biodigerido não esterilizado (cultivo padrão); biodigerido, não esterilizado com adição de CO<sub>2</sub> e III) biodigerido e esterilizado. A condição de cultivo da microalga em meio esterilizado surgiu devido à necessidade de minimizar a interferência da microalga nativa do efluente suíno e por conseguinte permitir que a microalga tenha condição de metabolizar a matéria orgânica e nutrientes presentes no efluente suíno de forma autônoma.

Os cultivos foram inoculados em seis fotobiorreatores tubulares do tipo *Airlift*, todos alimentados com ar comprimido cuja vazão é controlada por fluxômetros. Em dois dos reatores havia também a conexão para alimentação de CO<sub>2</sub> (30% v/v) proveniente de um cilindro de gás comprimido. A conexão foi feita de forma a permitir a diluição do dióxido de carbono com o ar comprimido. A FIGURA 4 mostra as conexões.

FIGURA 4 - SISTEMA DE *AIRLIFT* UTILIZADO PARA O ESTUDO.



FONTE: A Autora (2016).

Os cultivos foram mantidos com agitação constante, por meio de aeração com fluxo de ar atmosférico, proveniente de um compressor de ar. A iluminação foi com luz natural e a temperatura variável.

#### 4.3 Determinação da densidade celular

A densidade celular dos cultivos foi determinada por meio de contagens em microscópio óptico com aumento de 400X, com o auxílio de Câmara de Neubauer e realizada ao longo dos 18 dias de cultivo (LOURENCO, 2006). As contagens foram realizadas em triplicatas. Os resultados foram representados em números de células por mililitros de cultivo (célula mL<sup>-1</sup>).

#### 4.4 Determinação da biomassa seca

A determinação da biomassa seca foi realizada no primeiro dia de cultivo, no sétimo e no décimo quarto dia. A metodologia foi gravimétrica, sempre em triplicata para todos os cultivos. Foram utilizados microfiltros de fibra de vidro e a filtração foi acelerada por vácuo fornecido por uma bomba do tipo pistão. Os microfiltros foram levados à estufa com temperatura de 60°C até atingirem massa constante para a retirada de sua umidade natural. A massa dos microfiltros secos foi verificada em balança analítica com 5 casas decimais. Em seguida, três amostras de 5 mL dos cultivos foram retiradas e filtradas separadamente. Os microfiltros com as amostras foram levados à estufa a temperatura de 60°C até atingirem massa constante.

O cálculo do método gravimétrico utilizado para mensurar a biomassa seca em gramas por litros (gL<sup>-1</sup>) foi:

$$Bs = \frac{M_2 - M_1}{V}$$

Em que

Bs – biomassa seca da amostra (gL<sup>-1</sup>);

M<sub>1</sub> – massa do microfiltro seco (g);

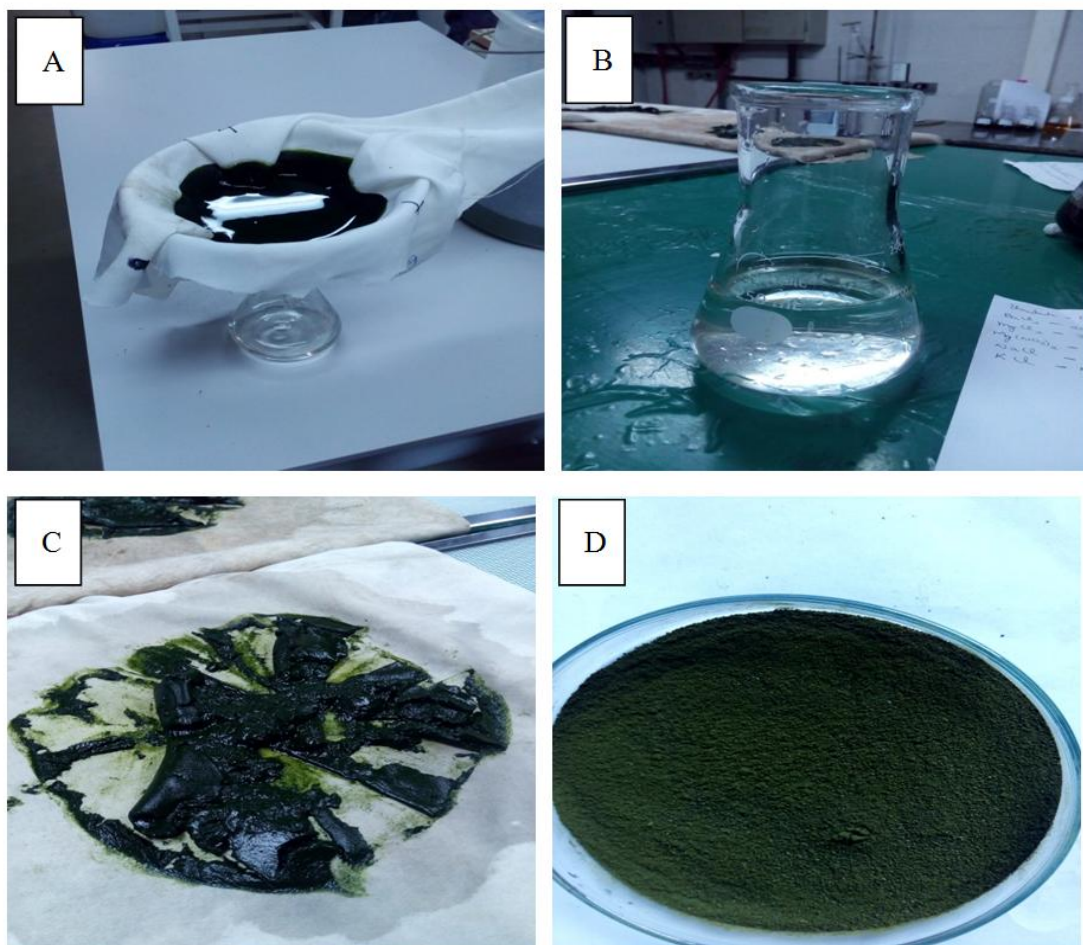
M<sub>2</sub> – massa do microfiltro com biomassa seca (g);

V – volume de cultivo filtrado (L).

#### 4.5 Recuperação da biomassa

Para a separação da biomassa foi escolhido o processo de sedimentação da biomassa via floculação mantendo-se a concentração inicial do Tanfloc SG em 300 mg/L. Todo o delineamento foi conduzido em equipamentos *jar test* equipados com béqueres com capacidade de 200 mL de amostra. A filtração foi realizada em tecido Oxford através de um filtro e em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 60°C por 24 horas. Após a secagem, a biomassa foi moída em um moedor de carne para seguir para as etapas de determinação de lipídeos e carboidratos. A FIGURA 5 (A-D) mostra as etapas.

FIGURA 5 - A) FILTRAÇÃO DA BIOMASSA; B) ASPECTO DA ÁGUA APÓS FILTRAÇÃO; C) PASTA DA BIOMASSA ANTES DA SECAGEM EM ESTUFA; D) BIOMASSA SECA MOÍDA.



FONTE: A Autora (2016).

#### 4.6 Determinação de lipídeos totais

Para o cálculo e mensuração de lipídeos totais dos cultivos, foi realizada a metodologia de extração a frio desenvolvida por Bligh e Dyer (1959) adaptada de Rodrigues *et al.* (2007). Para a extração dos lipídeos, utilizou-se uma solução de metanol e clorofórmio. As análises foram realizadas em triplicata em cada condição de cultivo.

Em cada uma das triplicatas, foram maceradas e aferidas a massa de 50 mg de biomassa seca anteriormente em estufa até massa constante. Na sequência, foram colocadas em tubos de polipropileno de 15 mL. A cada uma das amostras, foi adicionado 3 mL da solução de clorofórmio:metanol (2:1, v:v) e 10 µL de solução de butilhidroxitolueno (BHT) 1% em metanol, como proteção antioxidante e preservação da estrutura dos lipídeos poli-insaturados. Após, as amostras foram submetidas por três ciclos de 15 minutos em banho de ultrassom (Única Ultra Cleaner 1400, frequência de 40 kHz). As amostras foram envoltas em papel alumínio para proteção contra a luz e evitar a fotodegradação do material. Após isso, as amostras foram incubadas a 4°C por 24 horas para favorecer e aumentar a extração de lipídeos.

Seguidamente, as amostras foram submetidas a mais três ciclos de 15 minutos em banho de ultrassom e depois centrifugadas por 20 minutos a 5000 rpm a 5°C. O sobrenadante foi recuperado e reservado. Adicionou-se 1,5 mL da solução de clorofórmio:metanol 2:1 v/v à biomassa, que foi sedimentada após a centrifugação e essa mistura foi novamente centrifugada nas condições anteriores. A fase líquida foi recuperada e adicionada ao reservado.

No final, adicionou-se 2 mL de água destilada e 1 mL de clorofórmio ao reservado, agitou-se e centrifugou-se as amostras a 5000 rpm por 10 minutos a 5°C. A fase inferior foi recuperada e reservada em *vial* de massa conhecida. A fase aquosa foi lavada com 1 mL de clorofórmio, agitada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. A fase inferior foi transferida ao *vial* e este foi levado à capela de exaustão, onde permaneceu até que todo o solvente evaporasse. A seguir o *vial* teve sua massa novamente quantificada. O cálculo do utilizado para a mensuração de lipídeos foi:

$$Lipídeos Totais (mg.L^{-1}) = \frac{(V_2 - V_1) \cdot B}{C} \cdot 1000$$

Em que:

$V_1$  – massa do *vial* vazio (g);

$V_2$  – massa do *vial* com lipídeos (g);

B – biomassa seca do cultivo (g.L<sup>-1</sup>);

C – biomassa seca (g).

A determinação do teor de lipídeos em porcentagem consistiu em:

$$Lipídeos Totais (\%) = \frac{(V_2 - V_1) \cdot 100}{C}$$

#### 4.7 Determinação do pH dos cultivos

O pH dos cultivos foram aferidos diariamente em pHmetro digital da marca Gehaka PG 1800. A alteração do pH é um indício de atividade metabólica no meio, visto que em presença de CO<sub>2</sub> ocorre uma redução do pH a medida que a microalga vai fixando este gás pela ação da enzima RuBisCO (ribunose-1,5 bifosfato carboxilase oxigenase), ocorre uma elevação do pH (BECKER, 1994).

#### 4.8 Determinação de carboidratos

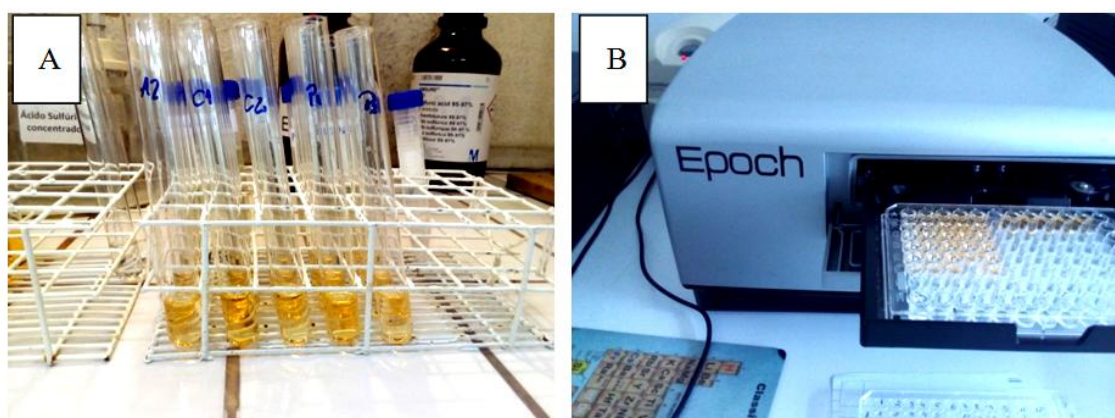
Os carboidratos totais foram determinados pelo método colorimétrico descrito por Dubois *et al*, (1956). Polímeros de carboidratos, quando em contato com um ácido forte e temperatura elevada, liberam pentoses e hexoses, que por sua vez são desidratadas produzindo furfural e 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. Estes aldeídos cíclicos condensam com o fenol formando um produto de coloração alaranjada (FIGURA 6A), cuja absorbância a 480 (pentoses) ou 490 nm (hexoses) é diretamente proporcional à quantidade de carboidrato. Foram preparadas soluções das amostras de polissacarídeos analisadas na concentração de 1 mg/mL em água destilada e uma alíquota de 500 µL de uma solução de fenol 5% (m/v) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Uma curva padrão de glucose foi feita no intervalo de detecção de 10-50 µg (TABELA 2), a partir de uma solução 0,1 mg/mL do padrão de água destilada. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro visível/UV da marca Epoch Biotek (FIGURA 6B) no comprimento de onda de 490 nm. Amostras cujas absorbâncias excederam o limite da curva-padrão foram diluídas conforme necessário.

TABELA 2 – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA ANÁLISE DE CARBOIDRATOS.

| Ponto  | Solução Padrão (µL) | H <sub>2</sub> O (µL) | Fenol (µL) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mL) |
|--------|---------------------|-----------------------|------------|-------------------------------------|
| Branco | -                   | 500                   | 500        | 2,5                                 |
| 1      | 100                 | 400                   | 500        | 2,5                                 |
| 2      | 200                 | 300                   | 500        | 2,5                                 |
| 3      | 300                 | 200                   | 500        | 2,5                                 |
| 4      | 400                 | 100                   | 500        | 2,5                                 |
| 5      | 500                 | -                     | 500        | 2,5                                 |

FONTE: DUBOIS (1956).

FIGURA 6 – A) COLORAÇÃO DAS AMOSTRAS COM O ÁCIDO SULFÚRICO; B) EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA A ABSORBÂNCIA.



FONTE: A Autora (2016).

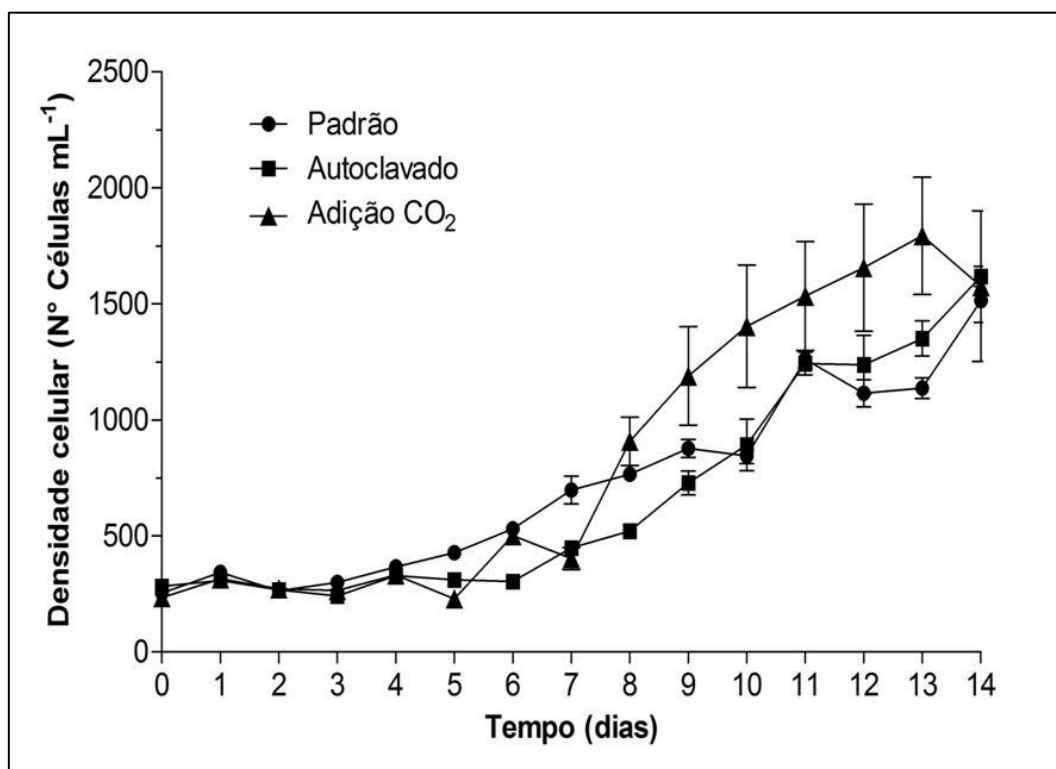


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Quantificação de densidade celular

A densidade óptica do cultivo apresentou comportamento similar e corroborativo com a densidade celular, comprovando a relação de biomassa presente no cultivo. Observou-se que, após 7 dias de cultivo, o meio que recebeu gás carbônico respondeu de forma bastante positiva quanto ao aumento do número de células. Foi também constatado que na primeira semana, o cultivo cujo dejetto foi esterilizado gerou resultados inferiores às outras condições, porém, se recuperou bem, chegando a superar o padrão, conforme FIGURA 7. Quanto à biomassa total, o cultivo padrão apresentou a concentração final de  $1,19 \text{ g L}^{-1}$ , com adição de  $\text{CO}_2$  o resultado obtido foi de  $1,34 \text{ g L}^{-1}$  e o experimento com dejetto esterilizado foi  $1,13 \text{ g L}^{-1}$ .

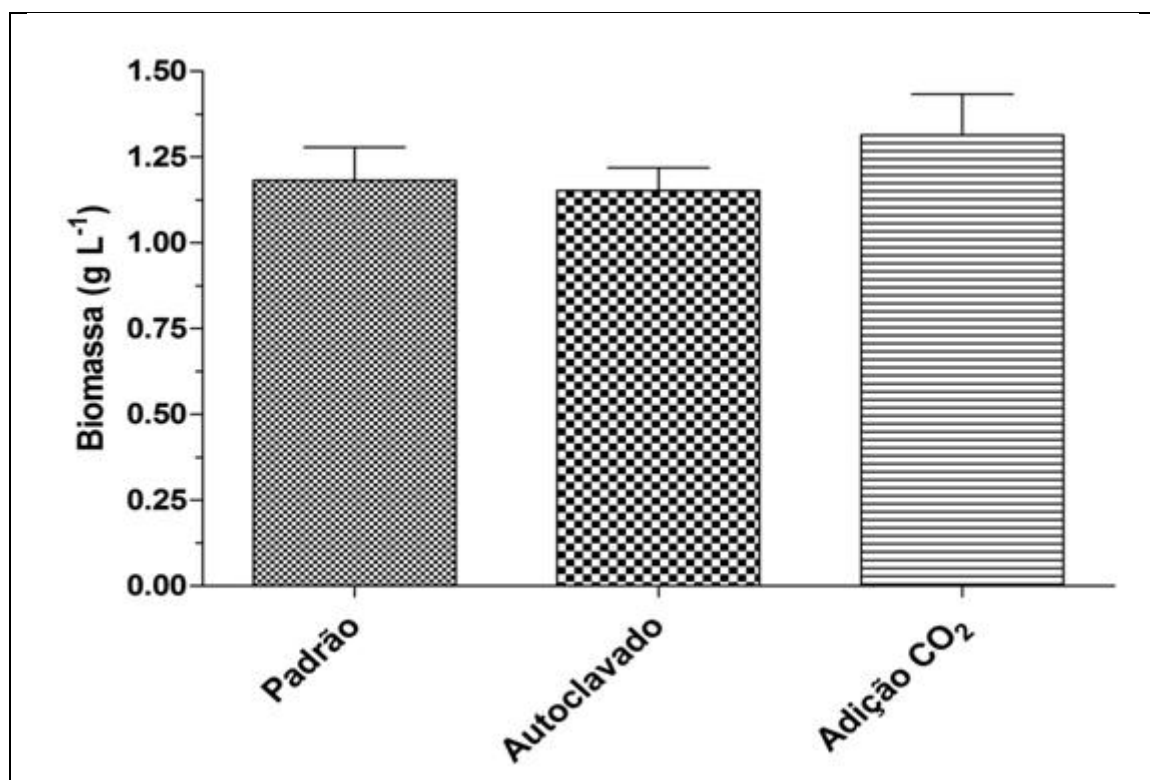
FIGURA 7 - QUANTIFICAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DE *Acutodesmus obliquus* APÓS 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.



FONTE: A Autora (2016).

Aproximadamente até o 4º dia as três condições de cultivo estavam na fase de adaptação. O cultivo com a adição de CO<sub>2</sub> durante duas horas por dia alcançou o resultado esperado quanto a densidade celular.

A FIGURA 8 - PRODUÇÃO OBTIDA NOS TRÊS CULTIVOS APÓS 14 DIAS DE CULTIVO DE *Acutodesmus obliquuos*.

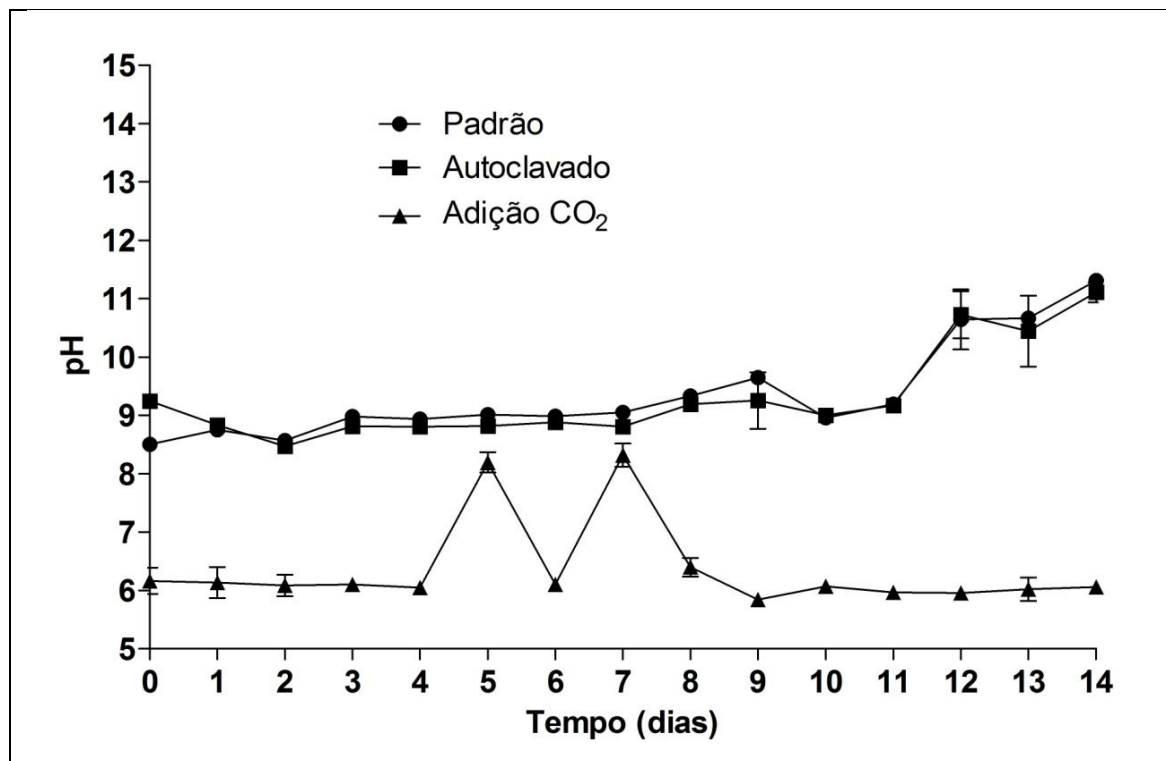


FONTE: A Autora (2016).

## 5.2 Variação do pH

Ao longo dos dias de cultivo, os valores referentes ao pH tiveram comportamentos distintos em relação ao meio de cultivo (Figura 9). O cultivo não esterilizado e o esterilizado tiveram um aumento de 3 unidades do pH, saindo de pH 8,0 para o pH 11,0. O cultivo não esterilizado com adição de CO<sub>2</sub> iniciou com pH 5,0 e chegou ao final do cultivo com pH 6,08, isso se deve ao meio ficar acidificado com a adição de CO<sub>2</sub>.

FIGURA 9 - pH DOS CULTIVOS DE *Acutodesmus obliquus* POR ATÉ 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVO.



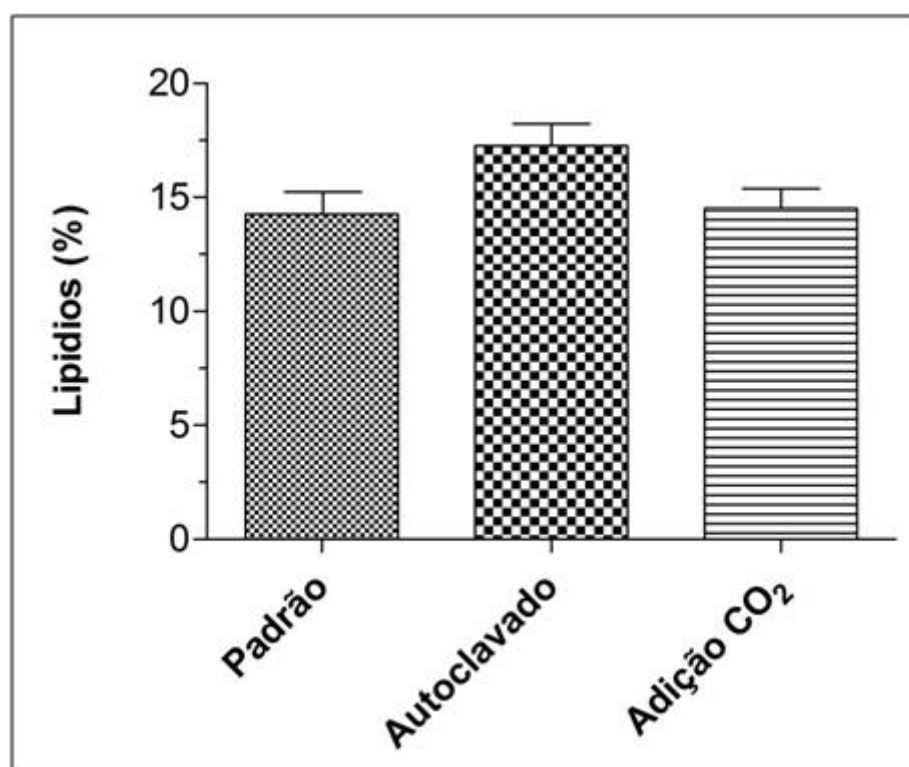
FONTE: A Autora (2016).

### 5.3 Quantificação de lipídeos totais

O teor de lipídeos medido através do método de Bligh e Dyer (1959) mostra que a condição de cultivo com adição de CO<sub>2</sub> teve um resultado semelhante ao cultivo padrão.

Os cultivos mixotróficos apresentam teores de lipídeos maiores, porém isso não foi observado no estudo, conforme representado na FIGURA 10.

FIGURA 10 - PRODUTIVIDADE DE LIPÍDEOS DE *Acutodesmus obliquus* POR ATÉ 14 DIAS EM 3 CONDIÇÕES DE CULTIVOS.

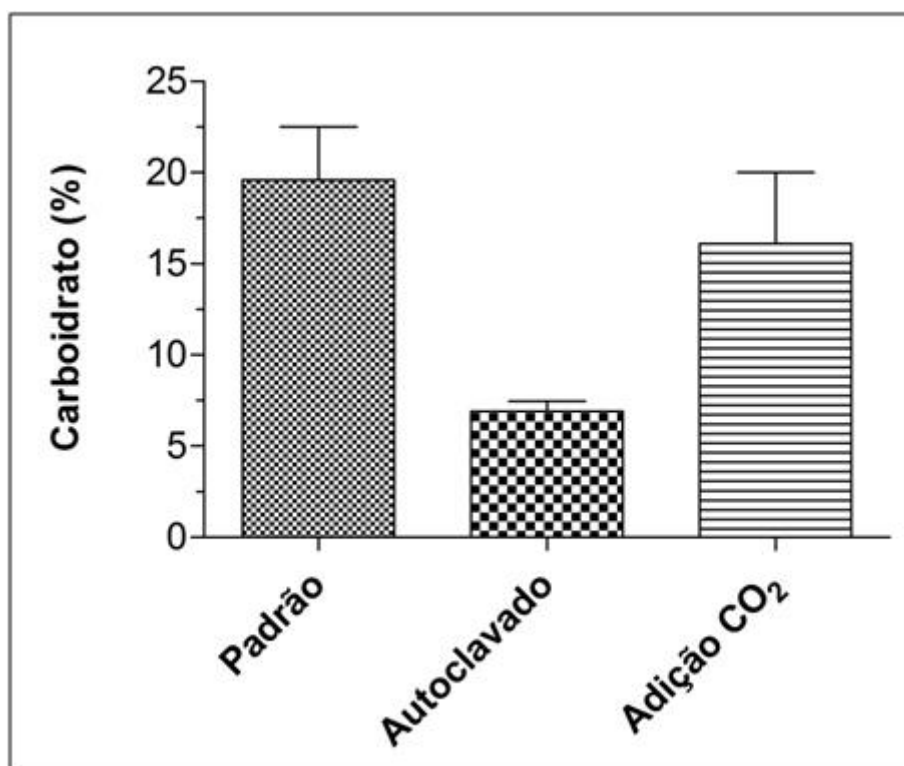


FONTE: A Autora (2016).

#### 5.4 Quantificação de carboidratos

O teor de carboidratos medidos através do método de Dubois mostrou que o cultivo na condição mixotrófico teve um maior aumento do número de células com a adição de CO<sub>2</sub>, que passa a ser consumido a partir do nono dia, no entanto, o teor de carboidratos em relação ao padrão teve resultado significativo, medido após os 14 dias de cultivo (FIGURA 11).

FIGURA 11 - TEOR DE CARBOIDRATOS NOS CULTIVOS DE *Acutodesmus obliquus* APÓS 14 DIAS DE CULTIVO.



FONTE: A Autora (2016).

## 6 CONCLUSÃO

Foram observadas diferenças significativas entre os meios de cultivo com relação ao aumento do teor de lipídeos na biomassa seca de microalgas. Com o tratamento térmico do efluente em autoclave, foi possível remover parte dos microrganismos contaminantes e aumentar a biodisponibilidade da matéria orgânica e nutriente do efluente suíno biodigerido e, com isto, aumentar a produtividade celular e de biomassa.

Uma vez que os lipídeos de biomassa extraídos são transesterificados para a produção deste combustível, é necessário que a microalga tenha uma grande reserva de lipídeos. Os experimentos mostraram que nenhum meio de cultivo favoreceu este aumento de teor que pudesse se correlacionar com o aumento da produção de biodiesel. Entretanto, se com o uso de dejetos suínos o

resultado não foi pior que com o meio padrão, isto indica que dejetos de suínos e outros animais de criação poderão ser tratados e ainda manter a produção de lipídeos de microalgas.

Os ensaios realizados com a injeção de CO<sub>2</sub> apresentaram resultados satisfatórios quanto ao teor de carboidratos, aumentando a densidade celular, produtividade e a biomassa seca. Isso mostra que a produção de bioetanol derivado de biomassa de microalga pode ser aumentada quando o meio de cultivo é submetido a concentrações superiores de gás carbônico. Isto ocorre, porque a quantidade de carboidratos na biomassa facilita o processo de fermentação para produção de álcool combustível. A vantagem em se utilizar a injeção de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo é, ainda, relacionada com a possibilidade de mitigar este gás que poderia ser lançado na atmosfera, isto é, o meio de cultivo com injeção dióxido de carbono mostrou que a não mortalidade das células torna estes microrganismos um potencial para redução das emissões causadoras de efeito estufa. A adição de CO<sub>2</sub> no meio de cultivo mostrou-se viável para a produção de bioetanol em relação à produção de biodiesel.

## **7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Para dar continuidade a este trabalho, apresentam-se as seguintes sugestões:

- Testar o CO<sub>2</sub> proveniente dos processos de combustão como fonte de carbono, a fim de diminuir os custos nos cultivos e associar o processo à redução do efeito estufa.
- Determinar a melhor concentração de CO<sub>2</sub> no cultivo.
- Investigar a tolerância e o crescimento das microalgas com outros resíduos agroindustriais, que poderão servir de substrato.

## REFERÊNCIAS

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p. 3402-3410, 2011.

ANDRULEVICIUTE, V. et al. Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloopsis* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. **Journal Applied Phycology**, v. 26, p. 83-90, 2014.

BECKER, E. W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. Cambridge University Press, 1994.

BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**. São Carlos: RiMa, 2005.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 557-577, 2010.

CARPENTER, S. R. et al. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological Applications**, v. 8, p. 559-568, 1998.

CHEN, C.-Y. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71-81, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410011648>>. Acesso em: 12 agosto 2016.

CHEN, P. et al. Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. **International Journal of Agricultural e Biological Engineering**, v. 2, n. 4, p. 1-30, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology advances**, v. 25, p. 294-306, 2007.

DUBOIS, M. et al. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60111a017>>. Acesso em: 14 agosto 2016.

GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenge. **Journal of the Royal Society Interface**, 2009.

GROBBELAAR, J. U. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In: RICHMOND, A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Science**, p. 97-115, 2004

GUILLARD, R. R. L. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. In: SMITH, W.L.; CHANLEY, M.H. (Eds). Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum, 1975.

HEGEWALD, E.; WOLF, M. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. **Plant Systematics and Evolution**, v. 241, p. 185-191, 2003.

HUANG, G. et al. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, p. 38-46, 2010

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ (TECPAR). **Manual de Biossistemas Integrados na Suinocultura**. Centro de Integração de Tecnologia do Paraná – CITPAR. Telus – Rede Paranaense de Projetos em Desenvolvimento Sustentável. Curitiba: Paraná, 2002.

KRAPAC, I. G. et al. Impacts of swine manure pits on groundwater quality. **Environmental Pollution**, v. 120, pp. 475-492, 2002.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 1043-1049, 2009.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 2006.



MANDAL, S.; MALLICK, N. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 281-291, 2009.

MARTINEZ, M. E. et al. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.

MIYAWAKI, B. **Purificação de biogás através de cultivo de microalgas em resíduos agroindustriais**. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

OLIVEIRA, A. C. **Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus sp.* em efluente de bovinocultura biodigerido**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PIRES, J. C. M. et al. Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 3043-3053, 2012.

RAVEN, P. H.; Eichhorn, S. E.; Evert, R. F. **Biologia Vegetal**. 8 ed. Guanabara Koogan, 2014

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture. Biotechnology and Applied Phycology**. Blackwell Science, 2004.

RIGANO, V. D. M. et al. The physiological significance of light and dark NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Chlorella sorokiniana*. **Phytochemistry**, v. 47, p.177-181, 1998.

RODRIGUES, M. L. et al. Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport. **Eukaryot Cell**, v. 6, p. 48-59, 2007.

RUIZ, J. et al. Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, p. 884-896, 2011.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials. **International Journal of Energy Research**, v. 35, p. 291-311, 2011.

SELESU, N. F. H. **Desenvolvimento do processo de produção de microalgas em Fotobiorreator industrial usando efluente suíno biodigerido**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

SILVA, D. A. **Produção de biomassa de microalgas cultivadas em esgoto sanitário biodigerido visando a produção de biodiesel**. 105 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

TAHER, D. M. **Biodiesel De Microalgas Cultivadas Em Dejeito Suíno Biodigerido**. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

VARGAS, J. V. C. et al. The microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, n. 18, p. 588-9598, 2014.

XIONG, W. et al. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 29-36, 2008.

YOO, C. et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 71-74, 2010.